Physiol. Vég., 1986, **24** (2), 193-200

Utilisation du phytate et activités phosphatases acides chez *Pisolithus tinctorius*, basidiomycète mycorhizien

Daniel MOUSAIN et Louis SALSAC

Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines, I.N.R.A.-E.N.S.A., Montpellier, France.

(Manuscrit reçu le 8 juillet 1985; accepté le 17 octobre 1985)

Mousain, D. and Salsac, L. 1986. Utilisation du phytate et activités phosphatases acides chez *Pisolithus tinctorius*, basidiomycète mycorhizien. — Physiol. Vég. 24: 193-200.
Phytate utilization and acid phosphatase activities in Pisolithus tinctorius, *a mycorrhizal basidiomycete.*

The growth, ionic accumulation (phosphate, K^+, Ca^{2+}) and acid phosphatase activities of the mycelium of *Pisolithus tinctorius* grown either on orthophosphate or on phytate were compared, after a previous culture on an orthophosphate deficient or complete medium. The orthophosphate deficient medium induced a high degree of phytate hydrolysis thereby releasing orthophosphate in the medium. The growth and phosphate accumulation in the thalli grown on phytate were similar to those observed on medium rich in orthophosphate. In addition, the calcium content was greater in the thalli grown on phytate than those grown on orthophosphate. The hydrolysis of phytate was the result of an enzymatic activity which increased gradually with increasing deficiency of orthophosphate. The phosphate released by this hydrolysis subsequently contributed to the inhibition of the phosphatase activities. On the mycelial homogenate, the orthophosphate deficiency induced the specific phytase activities proportionally more than the *p*-nitrophenylphosphatase activities, although the former represented only 1 to 2 per cent of the latter.

Additional key word— Phosphate deficiency.

D. Mousain (reprint requests) and L. Salsac, Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines, I.N.R.A.-E.N.S.A., 9 place Viala, 34060 Montpellier cedex, France.

Résumé. *La croissance, l'accumulation ionique (phosphate, K^+, Ca^{2+}) et les activités phosphatases acides de* Pisolithus tinctorius *ont été comparées chez du mycélium cultivé sur orthophosphate et phytate, consécutivement à une pré-culture sur milieu carencé ou non en orthophosphate. La carence préalable en orthophosphate du milieu provoque une importante hydrolyse du phytate, donc la libération d'orthophosphate dans le milieu : la croissance et l'accumulation de phosphate dans les thalles sont alors comparables à celles observées sur milieu bien pourvu en orthophosphate; de plus, la teneur en calcium des mycéliums cultivés sur phytate est plus élevée que celles des thalles cultivés sur orthophosphate. L'hydrolyse du phytate résulte d'une activité enzymatique qui est d'autant plus élevée que le milieu est carencé en orthophosphate. Le phosphate libéré par cette hydrolyse contribue à l'inhibition ultérieure des activités phosphatases. Les activités phytases spécifiques mesurées sur un homogénat mycélien sont proportionnellement plus augmentées que les activités* p-*nitrophénylphosphatases par la carence en orthophosphate, bien qu'elles ne représentent que* 1 *à* 2% *de ces dernières.* Mot clé additionnel : carence en orthophosphate.

Abbreviations. MS, matière sèche; Pase, phosphatase; Ph, phytate; Pi, orthophosphate; PNP, *p*-nitrophénol; PNPP, *p*-nitrophénylphosphate de sodium; PNPPase, *p*-nitrophénylphosphatase; prot, protéines; Tris, tris (hydroxyméthyl)-aminométhane

Physiologie Végétale 0031-9368/86/02 193 08/$ 2.80/ © Gauthier-Villars

INTRODUCTION

Les basidiomycètes ectomycorhiziens des pins présentent des activités phosphatases acides qui sont généralement mesurées en utilisant comme substrat le *p*-nitrophénylphosphate de sodium (PNPP) (Calléja *et al.*, 1980; Mousain et Salsac, 1982; Calléja et d'Auzac, 1983). Or, les phosphates organiques, en particulier les phytates, représentent une part non négligeable du phosphore total du sol (Anderson, 1967; Cosgrove, 1967). Divers microorganismes du sol (bactéries, champignons filamenteux et levures) possèdent des phytases acides, surtout extracellulaires, qui hydrolysent activement les phytates de Na et de Ca (Casida, 1959; Greaves *et al.*, 1967; Shieh et Ware, 1968; Greenwood et Lewis, 1977). Des champignons mycorhiziens sont capables d'utiliser convenablement les phytates de Na et Ca, totalement ou partiellement solubles, mais rarement et faiblement le phytate ferrique, insoluble (Theodorou, 1968; Duclos, 1981; Mitchell et Read, 1981; Dighton, 1983). L'association d'une bactérie rhizosphérique avec des ectomycorhizes à *Pisolithus tinctorius* stimule la mobilisation et l'absorption du Pi ainsi que la croissance de *Pinus caribea* en présence de phytine (Chakly et Berthelin, 1982). La déphosphorylation des phytates, observée en particulier avec quatre champignons ectomycorhiziens des pins, résulterait plutôt d'une hydrolyse enzymatique que d'un abaissement du pH du milieu (Theodorou, 1968). Une étude électrophorétique a montré ultérieurement que les activités phytases de l'une des espèces précédentes (*Rhizopogon luteolus*) s'exercent suivant deux voies pouvant conduire à deux pentaphosphates isomères, à partir de l'hexaphosphate de myoinositol (Theodorou, 1971).

Des études comparatives des activités phosphatases (Pases) accessibles au phytate de Na (Dighton, 1983; Mousain, résultat non publié) ou présentes dans le milieu de culture (Dighton, 1983; Espiau, résultat non publié), indiquent que les activités phytases acides des champignons ectomycorhiziens varient considérablement suivant l'espèce (voire l'isolat) considérée. Elles sont aussi susceptibles de dépendre fortement de la concentration en Pi du milieu, comme cela a été démontré chez *Aspergillus ficuum* (Shieh et Ware, 1968).

Nous avons donc voulu vérifier qu'un isolat de *Pisolithus tinctorius*, mycorhizogène des pins, était réellement capable d'utiliser le phytate de Na pour sa croissance *in vitro* et possédait des activités Pases vis-à-vis de deux substrats : le PNPP et le phytate de Na (Ph). Une telle étude combinant deux approches quantitatives (croissance du champignon en présence de phytate de Na comme source exclusive de P et dosage du Pi libéré à partir de ce phytate; mesure des activités Pases potentielles des thalles dans diverses conditions de culture) n'a, semble-t-il, été réalisée qu'une fois sur des champignons ectomycorhiziens (Dighton, 1983). Préalablement à leur croissance en présence de Pi ou de Ph, les thalles ont été cultivés sur milieu relativement carencé (Pi 0,01 mM) ou concentré en Pi (Pi 1 mM), cette pré-culture étant susceptible de favoriser ou au contraire d'inhiber l'hydrolyse enzymatique du phytate.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conditions de culture. Les thalles d'un isolat de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch., obtenu et répertorié sous le n° 9 au Laboratoire, sont cultivés initialement sur deux milieux gélosés qui comprennent du NaH_2PO_4 (0,01 mM ou 1 mM); la composition en autres éléments de ces milieux est identique à celle utilisée pour préparer les cultures-mères lors d'une étude antérieure (Mousain et Salsac, 1984). Dans une première série d'expérience, des implants mycéliens issus de ces cultures-mères sont répartis selon la technique déjà décrite (Mousain et Salsac, 1984) sur 100 ml de milieux liquides ayant l'une ou l'autre des compositions précédentes (Pi 0,01 mM ou 1 mM). Après 12 j de pré-culture sur ces deux milieux, les thalles sont lavés aseptiquement dans une solution isotonique de glucose (55 mM) puis transférés sur deux milieux liquides comprenant soit du Pi 1 mM, soit du phytate de Na 0,167 mM.

Pour chaque milieu de culture, 28 répétitions sont réalisées qui sont issues pour moitié de chacun des deux milieux de pré-culture. La durée de la culture est de 14 j. Le milieu de culture avec Pi 1 mM est identique au milieu de pré-culture correspondant, de même que la formule de base du milieu Ph à l'exception du Pi remplacé par le Ph. Le pH de toutes ces solutions est ajusté à 5,5 avant autoclavage à 115°C-120°C pendant 30 min. A 90 ml de milieu de base autoclavé sont ajoutés 10 ml de phytate 1,667 mM (Sigma P 5756), stérilisé par filtration. Une vingtaine de fioles supplémentaires comprenant 100 ml de ce milieu avec du phytate 0,167 mM sont réservées comme témoins non ensemencés. La deuxième expérience a pour but d'étudier les activités phosphatases acides de thalles de *P. tinctorius* (isolat n° 9) cultivés pendant 21 j sur les deux milieux de préculture précédents (avec Pi 0,01 mM ou 1 mM).

Dosages. Les dosages de P total et de cations (K^+, Ca^{2+}) des thalles ou des milieux de culture sont effectués selon des méthodes précédemment utilisées (Mousain et Salsac, 1984). Pour déterminer le Pi libre du milieu de culture, la colorimétrie de Taussky et Shorr (1953) est réalisée directement sur une partie aliquote de milieu séparé du mycélium par filtration. Les masses de matière sèche des thalles sont déterminées après lavage à l'eau distillée et séchage pendant 24 h à 80°C.

Activités phosphatases. Les activités PNPPases accessibles sont mesurées après incubation du thalle dans 10 ml du milieu suivant : PNPP 10 mM, tampon Tris-maléate-NaOH 0,1 M (pH 5,6) ; les activités phytases « accessibles » sont déterminées par dosage du Pi libéré après incubation dans 8 ml du milieu suivant : phytate de Na 3 mM, tampon acétate-NaOH 0,1 M (pH 5,6), le témoin étant représenté par cette solution mise à incuber en parallèle ; les activités PNPPases et phytases totales des mycéliums sont mesurées sur des homogénats mycéliens obtenus en présence d'un tampon cacodylate de Na 50 mM (pH 6,0) additionné de Triton X-100 (0,02 %) et de 2-mercaptoéthanol 5 mM. Les résultats sont exprimés en nanokatals de *p*-nitrophénol (PNP) ou d'orthophosphate (Pi) libéré par thalle ou par gramme de matière sèche (nkat thalle^{-1} ou nkat g^{-1} MS) ou en activité spécifique (nkat mg^{-1} prot). Dans ce dernier cas, la masse de protéines est déterminée après précipitation à l'acide trichloracétique d'une fraction aliquote de l'homogénat mycélien, obtention d'un culot par centrifugation à basse vitesse, minéralisation de ce sédiment (Umbreit et Burris, 1959) et colorimétrie selon Nessler (facteur de conversion des quantités d'azote en protéines : 6,25).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Croissance et accumulation ionique dans les thalles

Croissance et accumulation de phosphore dans les thalles

La croissance des thalles est équivalente sur phytate et orthophosphate. Les seules différences significatives de croissance constatées sont consécutives au pré-traitement (*tab.* 1) ; les douze jours de pré-culture sur milieu carencé en Pi (0,01 mM) conduisent à une croissance moindre que dans l'autre cas (Pi 1 mM), au terme de l'expérience (26 j).

La carence préalable en orthophosphate n'a pas d'influence sur la teneur finale en phosphore des thalles cultivés constamment en présence de Pi. Par contre, cette carence conduit à une utilisation beaucoup plus importante du phytate : les thalles carencés puis transférés sur milieu Ph accumulent alors plus de phosphore que ceux cultivés sur Pi (augmentation de 58 % de la quantité moyenne de P accumulée par thalle, et de 45 % de la teneur en P des mycéliums) (*tab.* 1). La teneur en P des mycéliums cultivés sur phytate consécutivement à une carence préalable en Pi, est la plus élevée de l'expérience (269 µmol Pi g^{-1} MS soit 8,4 mg P g^{-1} MS).

L'accumulation importante de phosphore chez les mycéliums cultivés sur Ph suite à un pré-traitement sur Pi 0,01 mM pourrait être due à une forte hydrolyse du phytate suivie d'une absorption intense du Pi libéré dans le milieu. Une éventuelle absorption directe du phytate par les mycéliums est aussi une hypothèse plausible.

Tableau 1. *Croissance et accumulation de P dans les thalles du* Pisolithus tinctorius *après* 12 *j* (*pré-culture*) *et* 26 *j sur orthophosphate ou phytate.* Les intervalles de confiance des moyennes sont calculés pour $p = 0{,}05$.

Pré-culture	Culture	Matière sèche (mg MS)	P accumulé (µmol thalle^{-1})	Teneur en P (µmol g^{-1} MS)
A. Pi 0,01 mM	—	11,0 ± 1,0	0,6 ± 0,2	50,1 ± 22,9
	Pi 1 mM	80,3 ± 10,2	13,7 ± 2,2	185,5 ± 38,4
	Ph 0,167 mM	83,5 ± 7,4	21,6 ± 2,7	269,4 ± 46,9
B. Pi 1 mM	—	26,8 ± 2,4	3,8 ± 1,0	139,4 ± 28,7
	Pi 1 mM	144,9 ± 25,5	26,2 ± 5,9	187,3 ± 25,1
	Ph 0,167 mM	125,1 ± 16,8	15,3 ± 3,7	120,5 ± 40,7

Accumulation de potassium et de calcium

La culture sur phytate n'a pas d'influence significative sur la teneur en potassium des thalles qui varie d'environ 130 à 200 µeq K^+g^{-1}MS (*tab.* 2). Par contre, après une carence préalable en Pi, la teneur en calcium des mycéliums cultivés sur phytate est significativement plus élevée ($p = 0{,}01$) que celle des thalles cultivés sur Pi (*tab.* 2). Pour les 3 traitements où elles sont mesurables (*tab.* 2), ces teneurs en Ca^{2+} sont également plus élevées (de 20% à 100%) que celles observées précédemment dans des conditions très proches mais en présence d'orthophosphate exclusivement (Mousain et Salsac, 1984). Le calcium est vraisemblablement absorbé par le mycélium avec le Pi, résultant de la déphosphorylation du phytate (notamment suite à une pré-culture sur Pi 0,01 mM) ou présent en quantité élevée dans le milieu (26 j de croissance sur Pi 1 mM). Bien qu'il soit peu probable que des quantités importantes de phytate de Ca se soient formées dans la solution, la concentration en $CaCl_2$ des milieux de culture étant faible (0,1 mM), on ne peut exclure la possibilité d'une absorption (ou d'une adsorption) de P sous forme de phytate de Ca malgré l'encombrement de cette molécule. Cette hypothèse est suggérée par l'équivalence des teneurs en Ca^{2+} des « tissus » de *P. tinctorius* cultivé sur Ph quel que soit le mode de pré-culture (*tab.* 2), et par le fait que l'absorption de phytine par le Maïs et la Tomate a déjà été démontrée (Rogers *et al.*, 1940).

Tableau 2. *Teneurs en potassium et calcium du mycélium de* Pisolithus tinctorius *après* 26 *j de croissance.* Les intervalles de confiance des moyennes sont calculés pour $p = 0{,}05$.

Pré-culture	Culture	Teneur (µeq g^{-1} MS)	
		K^+	Ca^{2+}
Pi 0,01 mM	Pi 1 mM	141,9 ± 47,3	4,2 (± 7,0)
	Ph 0,167 mM	194,2 ± 49,2	23,2 ± 3,2
Pi 1 mM	Pi 1 mM	155,3 ± 102,6	37,2 ± 17,1
	Ph 0,167 mM	130,8 ± 45,1	22,2 ± 8,3

Hydrolyse du phytate et utilisation du phosphore

Les mycéliums préalablement carencés en P (pré-culture sur Pi 0,01 mM) provoquent l'hydrolyse du phytate : la quantité de Pi présente dans le milieu après 14 j de culture et la quantité de P accumulée dans les thalles représentent plus de 60% du phosphate initialement

Tableau 3. *Orthophosphate (Pi) libre et phosphore total présents dans le milieu avec phytate ou accumulé dans le mycélium de* Pisolithus tinctorius. Le Pi libre et le P total présents dans 100 ml de milieu sont déterminés après 14 j de culture sur phytate. Le P total dosé sur les mycéliums est la quantité accumulée entre le 13e et le 26e jour de croissance. Aux pH observés après 14 j de culture sur Pi (3,20) ou sur milieu phytate ensemencé (4,75) ou non (6,75), le P du milieu est respectivement : 3,9 ± 1,1 ; 3,6 ± 0,6 ; 5,7 ± 2,3. Les intervalles de confiance des moyennes sont indiqués pour $p = 0{,}05$.

Pré-culture	P du milieu (µmol Pi)		P total (µmol Pi thalle^{-1})
	Pi libre	P total	
Pi 0,01 mM	41,5 ± 9,0	80,7 ± 20,6	21,0 ± 2,7
Pi 1 mM	8,4 ± 0,9	83,1 ± 11,8	11,5 ± 4,1

présent sous forme de phytate (*tab.* 3). Ceci indique l'intensité de l'hydrolyse si on admet que l'absorption directe de phytate est de faible importance.

Lorsque les mycéliums n'ont pas été préalablement carencés (pré-culture sur Pi 1 mM), la quantité d'orthophosphate libre présente dans le milieu est faible (moins de 10% du P total restant) et à peine supérieure à celle due à l'hydrolyse spontanée du phytate, comme l'indiquent les valeurs mesurées sur des milieux non ensemencés (*tab.* 3).

Dans les deux conditions examinées (carence préalable ou non en Pi), les quantités de P hydrolysées et le pourcentage de ce phosphore qui est prélevé par les thalles de *P. tinctorius* se situent dans la gamme des valeurs observées par Dighton (1983) chez trois autres espèces ectomycorhiziennes.

Activités phosphatases acides

Activités accessibles

La carence relative en Pi du milieu pendant 12 j entraîne une augmentation très significative des activités PNPPases accessibles exprimées par thalle (*fig.* 1 A, comparaison *a* et *b*) ou par unité de MS (*fig.* 1 B, comparaison *a* et *b*). Après cette culture préalable, le transfert sur Pi 1 mM et pH 0,167 mM diminue les activités PNPPases exprimées par rapport à la MS (*fig.* 1 B, comparaison de *a* avec a_1 et a_2) jusqu'au niveau atteint par les mycéliums cultivés préalablement sur Pi 1 mM (*fig.* 1 B, *b*). Les activités PNPPases de *P. tinctorius* sont inhibées par le Pi présent dans le milieu de culture (Calléja *et al.*, 1980 ; Mousain et Salsac, 1982) : sur milieu phytate, l'inhibition de ces activités est donc très vraisemblablement provoquée par le Pi résultant de l'importante hydrolyse enzymatique du phytate (voir *tab.* 3).

Les activités phytases accessibles représentent environ 5% des activités PNPPases accessibles après une pré-culture sur milieu carencé en Pi ; ce pourcentage s'élève entre 10 et 15%, suite à une culture préalable sur Pi 1 mM. L'activité phytase par thalle est plus élevée après un pré-traitement sur milieu non carencé (*fig.* 2 A, comparaison *a* et *b*), ce qui peut être attribué à la meilleure croissance du thalle sur ce milieu ; en effet, les activités rapportées à l'unité de matière sèche ne sont pas significativement différentes. Ce résultat est en désaccord avec les données du tableau 3 qui indiquent que l'hydrolyse enzymatique du phytate est plus élevée chez les thalles carencés.

Cette contradiction résulte vraisemblablement de la méthode de mesure de l'activité phytase accessible (voir Matériel et Méthodes) : pendant l'incubation d'une durée de 30 à 90 min, une partie de l'orthophosphate provenant du phytate est absorbée par le mycélium

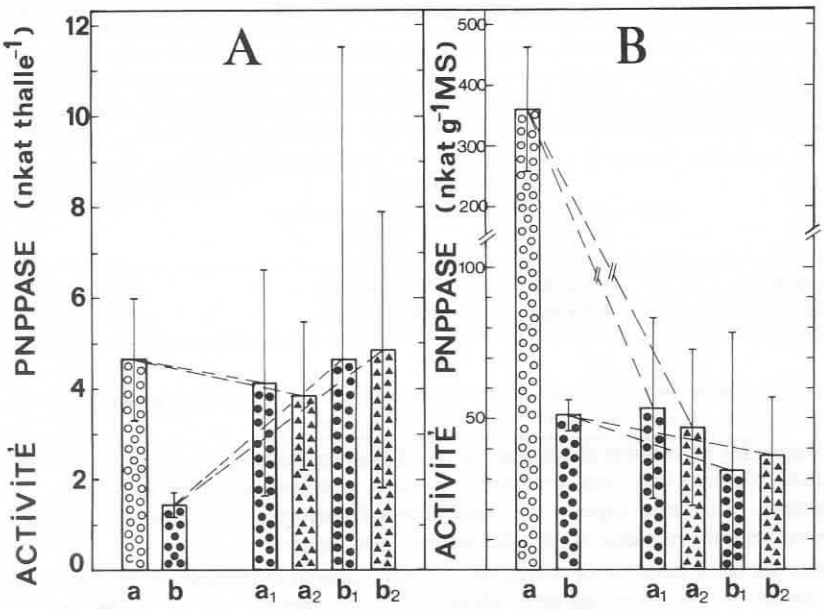

Figure 1. *Activités PNPPases accessibles de* Pisolithus tinctorius. (*a*), pré-culture (12 j) sur Pi 0,01 mM; puis (a_1), culture (14 j) sur Pi 1 mM, ou (a_2), culture (14 j) sur Ph 0,167 mM. (*b*), pré-culture (12 j) sur Pi 1 mM; puis (b_1), culture (14 j) sur Pi 1 mM ou (b_2), culture (14 j) sur Ph 0,167 mM. Les intervalles de confiance sont figurés pour $p = 0{,}05$.

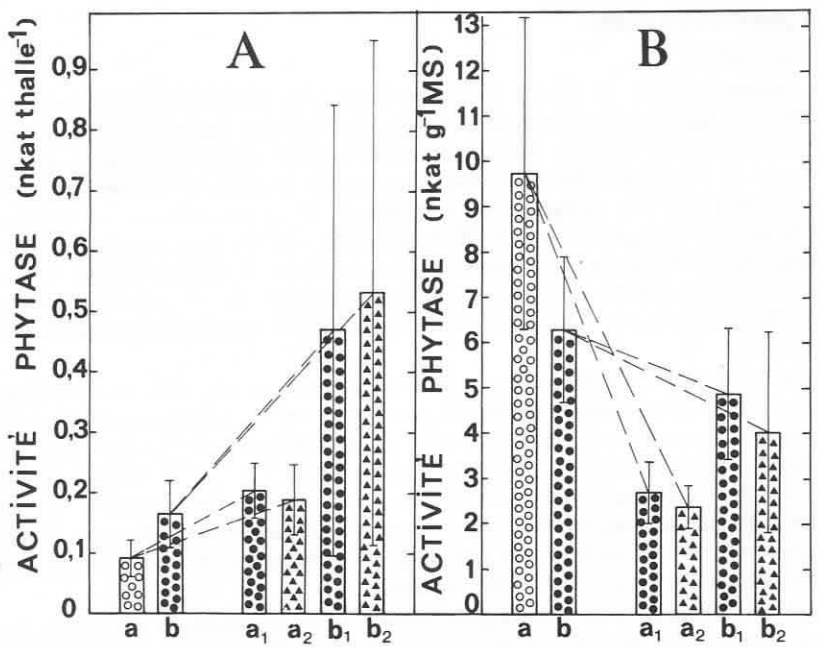

Figure 2. *Activités phytases accessibles de* Pisolithus tinctorius. Mêmes légendes que pour la figure 1.

et n'est donc pas prise en compte lors de la mesure d'activité. Les valeurs obtenues sous-estiment vraisemblablement l'activité réelle. Nous avons donc été conduits à mesurer l'activité phytase totale d'un homogénat de mycélium.

Activités totales

La carence en Pi du milieu exalte les activités Pases totales des mycéliums : l'augmentation est encore plus importante pour les activités spécifiques que pour les activités exprimées par thalle (*tab.* 4). Ces activités spécifiques sont légèrement sous-estimées en valeur absolue, la méthode de dosage de l'azote protéique utilisée (voir Matériel et Méthodes) ayant contribué à la pollution du culot protéique par la chitine pariétale; l'azote de cette chitine représenterait entre 13% et 16% de l'azote total chez *P. tinctorius* (Mention et Plassard, 1983). Les activités phytases totales mesurées sur cette espèce (*tab.* 4) sont du même ordre de grandeur que celles observées chez *Suillus granulatus* (Bousquet *et al.*, 1986) : environ 0,3 nkat mg^{-1} prot sur Pi 0,01 mM et moins de 0,1 nkat mg^{-1} prot sur Pi 1 mM.

Proportionnellement, la carence en Pi augmente plus l'activité phytase que l'activité PNPPase mais l'activité phytase spécifique ne représente que 1 à 2% de l'activité PNPPase dans les deux conditions expérimentales comparées (*tab.* 4).

Tableau 4. *Influence d'une carence relative en Pi du milieu sur les activités phosphatases totales de* Pisolithus tinctorius, *après* 21 *j.* Les répétitions des mesures sont respectivement au nombre de 5 sur Pi 0,01 mM et de 4 (PNPPases) et 3 (phytases) sur Pi 1 mM. Les intervalles de confiance des moyennes sont indiqués pour $p = 0,05$. Les valeurs entre parenthèses indiquent les rapports des activités entre les 2 milieux phosphatés.

Milieu	PNPPases totales		Phytases totales	
	(nkat $thalle^{-1}$)	(nkat mg^{-1} prot)	(nkat $thalle^{-1}$)	(nkat mg^{-1} prot)
Pi 0,01 mM	65,60 ± 12,37	22,57 ± 7,04	0,918 ± 0,182	0,363 ± 0,101
Pi 1 mM	28,22 ± 4,63	3,46 ± 1,36	0,290 ± 0,171	0,037 ± 0,034
	(2,3)	(6,5)	(3,2)	(9,8)

Bien que les activités Pases totales et accessibles n'évoluent pas nécessairement dans le même sens, les résultats présents sont en accord avec les observations précédentes et suggèrent que l'hydrolyse du phytate est plus intense lorsque les thalles sont préalablement carencés en phosphate.

CONCLUSION

Une carence préalable en Pi du milieu favorise l'utilisation du phytate par plusieurs champignons ectomycorhiziens (Espiau, résultat non publié; Mousain *et al.*, résultat non publié), notamment par *P. tinctorius*. Dans ce cas, une hydrolyse importante du phytate entraîne la libération d'orthophosphate dans le milieu : la croissance et l'accumulation de phosphate dans le mycélium sont alors comparables à celles observées sur milieu bien pourvu en Pi. Cette hydrolyse semble bien résulter d'une activité enzymatique spécifique du phytate, activité d'autant plus élevée que le milieu est carencé en Pi. Le phosphate libéré dans le milieu par l'hydrolyse du phytate contribue à l'inhibition ultérieure des phosphatases. Bien que les activités phytases ne représentent qu'une fraction très faible des activités PNPPases, elles sont susceptibles d'accroître la quantité de Pi disponible au voisinage du mycélium du champignon mycorhizien et dans la mycorhizosphère. Néanmoins, il est indispensable de vérifier si les mycéliums sont capables ou non d'absorber directement le phytate.

BIBLIOGRAPHIE

Anderson G., 1967. — Nucleic acids, derivatives and organic phosphates. Dans *Soil Biochemistry*, **1,** A. D. Mc Laren et G. H. Peterson, éd., Marcel Dekker, New York, 67-90.

Bousquet N., Mousain D. et Salsac L., 1986. — Influence de l'orthophosphate sur les activités phosphatases de *Suillus granulatus* en culture *in vitro*. *Physiol. Vég.*, **24**, 153-162.

Calleja M. et Auzac J. (d'), 1983. — Activités phosphatases et carence phosphatée chez des champignons supérieurs. *Can. J. Bot.*, **61,** 79-86.

Calleja M., Mousain D., Lecouvreur B. et Auzac J. (d'), 1980. — Influence de la carence phosphatée sur les activités phosphatases acides de trois champignons mycorhiziens : *Hebeloma edurum* Metrod., *Suillus granulatus* (L. ex Fr.) O. Küntze et *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch. *Physiol. Vég.*, **18,** 489-504.

Casida L. E. (Jr.), 1959. — Phosphatase activity of some common soil fungi. *Soil Sci.*, **87,** 305-310.

Chakly M. et Berthelin J., 1982. — Rôle d'une ectomycorhize « *Pisolithus tinctorius-Pinus caribea* » et d'une bactérie rhizosphérique sur la mobilisation du phosphore de phosphates minéraux et organiques insolubles. Dans *Les Mycorhizes : biologie et utilisation*, S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson et A. Trouvelot, éd., I.N.R.A., Paris, 215-220.

Cosgrove D. J., 1967. — Metabolism of organic phosphates in soil. Dans *Soil Biochemistry*, **1,** A. D. Mc Laren et G. H. Peterson, éd., Marcel Dekker, New York, 216-228.

Dighton J., 1983. — Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, **71,** 455-462.

Duclos J. L., 1981. — Contribution à l'étude expérimentale des endomycorhizes des Éricacées. Étude sur *Erica carnea* L. et quelques variétés horticoles : aspects nutritionnels et ultrastructuraux. *Thèse Doct. 3e Cycle*, Université Claude Bernard, Lyon.

Greaves M. P., Anderson G. et Webley D. M., 1967. — The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta*, **132,** 412-418.

Greenwood A. J. et Lewis D. H., 1977. — Phosphatases and the utilisation of inositol hexaphosphate by soil yeasts of the genus *Cryptococcus*. *Soil Biol. Biichem.*, **9,** 161-166.

Mention M. et Plassard C., 1983. — Comparaison de la nutrition nitrique et ammoniacale de quatre espèces de Basidiomycètes ectomycorhiziens. *C. R. Acad. Sc.*, **297,** série III, 489-492.

Mitchell D. T. et Read D. J., 1981. — Utilization of inorganic and organic phosphates by the mycorrhizal endophytes of *Vaccinium macrocarpon* and *Rhododendron ponticum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **76,** 255-260.

Mousain D. et Salsac L., 1982. — Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des symbiotes ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association. Dans *Les Mycorhizes : biologie et utilisation*, S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson et A. Trouvelot, éd., I.N.R.A., Paris, 97-100.

Mousain D. et Salsac L., 1984. — Effet du phosphate et du calcium sur la croissance et l'accumulation ionique chez les champignons ectomycorhiziens en culture *in vitro*. *Can. J. Bot.*, **62,** 2600-2609.

Rogers H. T., Pearson R. W. et Pierre W. H., 1940. — Absorption of organic phosphorus by corn and tomato plants and the mineralizing action of exo-enzyme systems of growing roots. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **5,** 285-291.

Shieh T. R. et Ware J. H., 1968. — Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.*, **16,** 1348-1351.

Taussky H. H. et Shorr E., 1953. — A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **202,** 675-685.

Theodorou C., 1968. — Inositol phosphates in needles of *Pinus radiata* D. Don and the phytase activity of mycorrhizal fungi. *Trans. of the 9th Int. Congr. Soil Sc.*, Adelaïde, **3,** 483-490.

Theodorou C., 1971. — The phytase activity of the mycorrhizal fungus *Rhizopogon luteolus*. *Soil Biol. Biochem.*, **3,** 89-90.

Umbreit W. W. et Burris R. H., 1959. — Chemical methods. Dans *Manometric technics*, W. W. Umbreit, R. H. Burris et J. F. Stauffert, éd., Burgess Publishing Co, Minneapolis.